

Новый вариант гидрофильной хроматографии с участием ионных жидкостей на основе имидазола для определения высокополярных лекарственных препаратов в биологических жидкостях

В.Д. Сомова, Е.А. Бессонова, *Л.А. Карцова

Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 198504, г. Санкт-Петербург, Петродворец, Университетский пр., 26

**Адрес для переписки: Карцова Людмила Алексеевна, E-mail: kartsova@gmail.com*

Поступила в редакцию 23 июня 2017 г., после доработки – 18 июля 2017 г.

В работе исследованы возможности ионных жидкостей на основе имидазола в качестве модификаторов подвижной и неподвижной фаз в условиях обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии (HILIC) для разделения полярных биологически активных веществ (аминокислоты, витамины и лекарственные препараты). Показано, что введение ионных жидкостей (ИЖ) на основе имидазола в состав элюента приводит к динамической модификации поверхности сорбента C18, в результате увеличивается эффективность и селективность при разделении основных аналитов. Благодаря образованию гидрофильного покрытия обеспечивается возможность реализации режима HILIC. Изучены факторы, влияющие на разделение аналитов: длина алкильного радикала (C₄, C₆, C₈, C₁₂), природа противоиона (Cl⁻, BF₄⁻), концентрация ИЖ (0.1-20 мМ), pH элюента, концентрация буферного раствора и органической добавки. Показано, что с использованием традиционного катионного модификатора цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) с концентрацией ниже критической концентрации мицеллообразования (ККМ) условия HILIC не реализуются. Установлены пределы обнаружения в HILIC (0,01-1 мкг/мл), что достаточно для определения лекарственных препаратов в реальных объектах (сыворотка крови, моча). В выбранных условиях HILIC с участием ионной жидкости C₆MImCl проведен анализ образцов плазмы крови в присутствии препаратов: *л*-аминосалициловой кислоты, левофлоксацина, спарфлоксацина.

Ключевые слова: высокополярные лекарственные препараты, водорастворимые витамины, гидрофильная хроматография, ионные жидкости.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2017, vol. 21, no. 3, pp. 241-250

DOI: 10.15826/analitika.2017.21.3.004

A new version of hydrophilic interaction liquid chromatography with the use of ionic liquids based on imidazole for the determination of highly polar drugs in body fluids

V.D. Somova, E.A. Bessonova, *L.A. Kartsova

Saint Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

**Corresponding author: Ludmila A. Kartsova, E-mail: kartsova@gmail.com*

Submitted 23 June 2017, received in revised form 18 July 2017

A possibility of using ionic liquids based on imidazolium as modifiers of the mobile and stationary phases under the conditions of reversed-phase and hydrophilic chromatography (HILIC) for the separation of polar biologically active substances (amino acids, vitamins and drugs) has been investigated. It was shown that the introduction of imidazolium ionic liquids (IL) to the eluent led to the dynamic modification of the C18 sorbent surface which in turn led to the increased efficiency and selectivity of basic analytes separation. The realization of HILIC mode was possible due to the formation of a hydrophilic coating. Influences of the

alkyl radical (C_4 , C_6 , C_8 , C_{12}) length, nature of the counterion (Cl^- , BF_4^-), IL concentration (0.1 - 20 mM), pH of the mobile phase and concentration of organic additive on the efficiency and selectivity of the separation of polar drugs had been studied. In addition, the ability of cetyltrimethylammonium bromide (**CTAB**) to provide HILIC conditions in the concentrations lower than critical micelle concentration (**CMC**) has been investigated. The possibility of determining drugs (*p*-aminosalicylic acid and antibiotics levofloxacin, sparfloxacin) in blood plasma under HILIC conditions was shown.

Key words: highly polar drugs, water-soluble vitamins, hydrophilic chromatography, ionic liquids.

ВВЕДЕНИЕ

При определении биологически активных веществ, фармпрепаратов, остаточных содержаний лекарственных средств и их метаболитов в природных объектах традиционно используют обращенно-фазовую (**ОФ**) ВЭЖХ. В случае высокополярных аналитов требуется добавление в элюент ион-парных агентов. Если при этом возникает задача масс-спектрометрической (**МС**) идентификации, ион-парный вариант ВЭЖХ в сочетании с **МС** неприемлем [1]. Режим гидрофильной хроматографии (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – **HILIC**), является альтернативой **ОФ** ВЭЖХ для разделения высокополярных соединений, сочетающий особенности обращенно-фазового и нормально-фазового режимов: водно-органический элюент и полярная стационарная фаза, соответственно [2, 3]. В условиях **HILIC** молекулы аналита распределяются между подвижной фазой с большим содержанием органического растворителя и слоем воды, адсорбированным на гидрофильной стационарной фазе. Кроме того, между стационарной фазой и аналитом возможны электростатические, неспецифические взаимодействия и образование водородных связей. В зависимости от природы аналита и условий анализа преобладает тот или иной механизм [1-3].

Метод **HILIC** прекрасно зарекомендовал себя при разделении низкомолекулярных органических кислот, лекарственных средств основного характера, а также других нейтральных и заряженных веществ [1]; успешно применен при анализе аминокислот [2], углеводов [4, 5], пептидов [6], полярных фармацевтических препаратов [7, 8] и т.д.

В последнее десятилетие гидрофильная хроматография получила активное развитие в связи с производством специальных колонок. Подобного типа стационарные фазы можно создавать и в процессе динамической модификации с участием ряда гидрофильных реагентов. Роль таких реагентов могут выполнить ионные жидкости (**ИЖ**) на основе имидазола, способные модифицировать неподвижную фазу, образуя многослойные покрытия, а наличие имидазольного катиона и алкильных радикалов в структуре ионных жидкостей обеспечивает им дополнительные взаимодействия (электростатические, π - π , гидрофобные, образование водородных связей) как с неподвижной фазой, так и с определяемым веществом [9-12], что может оказать дополнительный резерв в увеличении се-

лективности разделения аналитов. Стационарные фазы на основе ионных жидкостей обычно получают путем ковалентной модификации сорбента [13-19].

Цель данного исследования – реализация режима гидрофильной хроматографии с участием ионных жидкостей как динамических модификаторов стационарной фазы для определения высокополярных препаратов в плазме крови.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. Ацетонитрил (для ВЭЖХ, «Acros organics»), муравьиная кислота («х.ч.», «Неохим»), дигидрат дигидрофосфат натрия («AppliChem»), ортофосфорная кислота («х.ч.», «Неохим»), ацетат аммония («Sigma»), ЦТАБ («Sigma»), ионные жидкости 1-бутил-3-метилимидазолий хлорид (C_4MImCl) (Acros organics), 1-гексил-3-метилимидазолий хлорид (C_6MImCl) (Acros organics), 3-метил-1-октилимидазолий хлорид (C_8MImCl) (Acros organics), 1-додецил-3-метилимидазолийхлорид ($C_{12}MImCl$) (Acros organics), 1-гексил-3-метилимидазолий тетрафторборат (C_6MImBF_4) (Acros organics), витамины В1 (> 99.0%), В3 (никотиновая кислота) (> 99.0%), В6 (> 99.0%), С (> 99.0%), аминокислоты фенилаланин (> 99.0%), триптофан (> 99.0%), тирозин (> 99.0%), противовоспалительные препараты кетопрофен (> 99.0%), ибупрофен (> 99.0%), антибиотики офлоксацин (> 99.0%), левофлоксацин (> 99.0%), моксифлоксацин (> 99.0%), спарфлоксацин (> 99.0%) «Sigma». Фармацевтическая субстанция *пара*-аминосалициловой кислоты.

Исходные растворы витаминов, аминокислот и противовоспалительных препаратов (1-2 мг/мл) готовили растворением точных навесок в водно-ацетонитрильном растворе (70 : 30 %, по объему). Для приготовления исходных растворов антибиотиков (1 мг/мл) точную навеску аналита 1 мг растворяли в 1 мл смеси ацетонитрил – 0.1 М раствор уксусной кислоты (70 : 30 %, по объему). Рабочие растворы готовили путем последовательного разбавления исходных растворов деионизированной водой. Растворы хранили при –20 °С.

Оборудование. Жидкостный хроматограф LC-30 Nexera с диодно-матричным детектором. Для обработки результатов анализа использовали программное обеспечение «LCsolution». Колонки: Luna C18(2) 150×4.6 мм, 5 мкм; Luna Silica 150×2 мм, 5 мкм; Luna C18(2) 150×3 мм, 3 мкм («Phenomenex», США); Zorbax SB C18 150×2.1 мм, 3 мкм (Agilent, США). Центрифуга – Thermo Scientific SL16 («Thermo», США) с системой охлаждения.

Таблица 1

Длины волн максимум поглощения аналитов, состав и pH элюентов при ОФ ВЭЖХ разделении аналитов

Table 1

Wavelengths of maximum absorbance of analytes, composition and pH of the eluents for the separation of analytes under RP HPLC conditions

Аналиты	Длина волны максимумов поглощения, нм	Состав подвижной фазы		pH подвижной фазы
		А (% об.)	Б (% об.)	
В1, В3, В6 С	234, 260 280	97	3	2.5 (фосфатный буферный раствор)
Тирозин, фенилаланин, триптофан	220, 280	97	3	2.0 (0.1% раствор НСООН)
Офлоксацин, спарфлоксацин, моксифлоксацин, лево- флоксацин	300, 375	85	15	2.5 (фосфатный буферный раствор)
пара - Аминосалициловая кислота	235, 265, 300	85	15	2.5 (фосфатный буферный раствор)
Кетопрофен ибупрофен	254 235, 265	60	40	7.0 (аммиачно-ацетатный буферный раствор)

Условия хроматографического анализа.

ОФ ВЭЖХ: колонка Zorbax SB C18 (150×2.1 мм, 3 мкм), изократический режим элюирования, состав подвижной фазы указан в табл. 1; скорость потока подвижной фазы (п.ф.) – 0.3 мл/мин; объем вводимой пробы – 20 мкл; детектирование на длинах волн максимумов поглощения (табл. 1).

Условия ОФ ВЭЖХ с ионной жидкостью

С₆MImCl в составе элюента: колонка Luna Silica (150×2 мм, 5 мкм), изократический режим элюирования 0.1 % раствор НСООН (pH = 2.0), С₆MImCl различной концентрации / CH₃CN (98 : 2 об. %), скорость потока п.ф. – 0.7 мл/мин; объем вводимой пробы – 20 мкл; детектирование на длинах волн максимумов поглощения (табл. 1).

Условия HILIC, реализованной с участием ИЖ:

колонка Luna C18(2) 150×4.6 мм, 5 мкм, в состав элюента добавляли ИЖ С₄MImCl, С₆MImCl, С₈MImCl, С₁₂MImCl, С₆MImBF₄ (10 mM). Большие значения эффективности при разделении витаминов, противовоспалительных препаратов отмечены в случае С₆MImCl, поэтому эта ИЖ выбрана для проведения последующих экспериментов, концентрация которой варьировалась (0.1 mM, 10 mM, 20 mM). Хроматографическое разделение аналитов проводили при изменении содержания воды в подвижной фазе (5-50 % об.) и концентрации ацетатно-аммиачного буферного раствора (5 mM, 10 mM). Выбранные условия: Luna C18(2) (150×4.6 мм, 5 мкм), изократический режим элюирования; 100 mM ацетатно-аммиачный буферный раствор (7.0) / CH₃CN, 10 mM С₆MImCl (5 : 95 % об.), скорость п.ф. – 0.7 мл/мин; объем вводимой пробы - 20 мкл; детектирование на длинах волн максимумов поглощения (табл.1).

Условия хроматографического анализа с введением ЦТАБ в элюент: Luna C18(2) (150×4.6 мм, 5 мкм), изократический режим элюирования; 100 mM ацетатно-аммиачный буферный раствор

(pH 7.0) / CH₃CN, 0.8 mM ЦТАБ (5 : 95 об. %), скорость п.ф. – 0,7 мл/мин; объем вводимой пробы – 20 мкл; детектирование на длинах волн максимумов поглощения (табл. 1).

Пробоподготовка. Процедура пробоподготовки плазмы крови включала осаждение белков и последующий ВЭЖХ анализ надосадочной жидкости. Использовали следующую схему [20]: к 100 мкл плазмы крови прибавляли 300 мкл ацетонитрила, встряхивали в течение 2 минут и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С, после чего переносили надосадочную жидкость в вials для хроматографического анализа.

В образцы плазмы крови добавляли лекарственные препараты, а затем проводили описанную выше процедуру пробоподготовки и хроматографический анализ. Пределы обнаружения аналитов (ПО) рассчитывали по отношению сигнал/шум = 3 : 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Методом ОФ ВЭЖХ на примере модельных систем аминокислот и витаминов обнаружено, что введение ИЖ в состав элюента блокирует остаточные силанольные группы на поверхности сорбента, что приводит к увеличению эффективности при разделении аминокислот и витаминов (табл. 2) по сравнению с их разделением в отсутствие ИЖ. Это обусловлено электростатическими взаимодействиями между катионом имидазолия ИЖ и остаточными силанольными группами стационарной фазы. Кроме того, возможно образование ассоциатов за счет π-π взаимодействий между определяемыми веществами и ионной жидкостью.

Таким образом, наблюдаемые изменения эффективности основных и кислотных аналитов подтверждают факт динамической модификации C18 сорбента ионной жидкостью С₆MImCl.

Таблица 2

Влияние ИЖ C_6MImCl на значения эффективности при разделении аналитов методом ОФ ВЭЖХ

Table 2

Influence of the ionic liquid C_6MImCl on the efficiency of the separation of analytes under RP HPLC conditions

Аналиты	Эффективность, т.т./м	
	0.1 % p-p HCOOH (pH=2) / CH_3CN (98 : 2, % об.)	0.1 % p-p HCOOH (pH=2), 10 мМ C_6MImCl / CH_3CN (98 : 2, % об.)
В1	111000 ± 1000	115000 ± 2000
В3	130000 ± 2000	160000 ± 3000
В6	360000 ± 5000	370000 ± 3000
С	300000 ± 4000	500000 ± 5000
Тирозин	25000 ± 1000	28000 ± 2000
Фенилаланин	37000 ± 2000	45000 ± 2000
Триптофан	140000 ± 3000	170000 ± 4000

Примечание: α – фактор селективности.**Реализация режима гидрофильной хроматографии с использованием ионных жидкостей**

Обнаружено, что добавление ионной жидкости C_6MImCl в состав подвижной фазы в условиях HILIC (CH_3CN – H_2O , 95 : 5 % об.) приводит к удерживанию таких аналитов как офлоксацин, водорастворимые витамины (В3, В1) и противовоспалительные препараты (кетопрофен, ибупрофен) (рис. 1). Поверхность обращенно-фазового сорбента, динамически модифицированного ИЖ, становится более гидрофильной, что способствует формированию слоя воды, необходимого для реализации условий HILIC: полярные аналиты удерживаются

за счет распределительного механизма, электростатических и π - π взаимодействий между аналитами и ИЖ.

Влияние добавки соли в составе подвижной фазы. Добавление в подвижную фазу соли – ацетата аммония (100 мМ ацетатно-аммиачный буферный раствор, pH = 7.0) приводит к росту параметров удерживания тестовых веществ и селективности разделения витаминов и нестероидных противовоспалительных средств – кетопрофена и ибупрофена. Это согласуется с литературными данными [16, 21, 22]: наличие солей в составе элюента способствует увеличению слоя воды у поверхности стационарной фазы, что в свою очередь, уве-

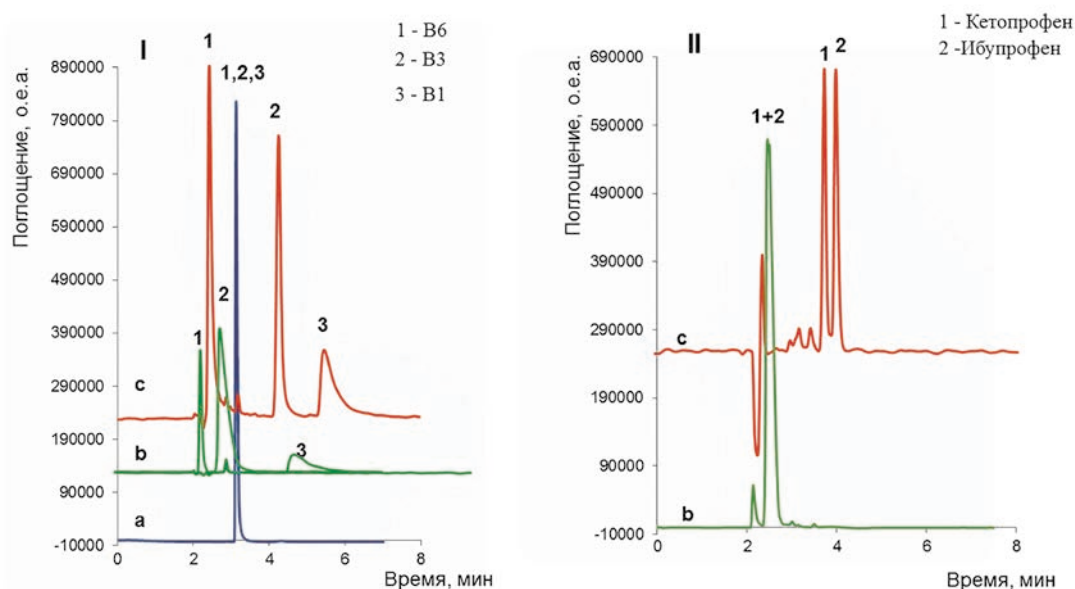


Рис. 1. Хроматограммы смеси витаминов (I) и противовоспалительных препаратов (II). Условия: Luna C18(2) (150×4.6 мм, 5 мкм), изократический режим элюирования, подвижная фаза: (a) H_2O / CH_3CN (5:95, % об.); (b) H_2O / CH_3CN , 10 мМ C_6MImCl (5 : 95, % об.); (c) H_2O , 100 мМ ацетатно-аммиачный буфер (pH = 7.0) / CH_3CN , 10 мМ C_6MImCl (5 : 95 % об.). Скорость подвижной фазы – 0.7 мл/мин; объем пробы – 20 мкл, УФ-детектирование: 275 нм

Fig. 1. Chromatograms of vitamins (I) and anti-inflammatory drugs (II) mixture. Conditions: Luna C18(2) (150×4.6 mm, 5 μ m), isocratic elution, mobile phase: (a) H_2O / CH_3CN (5 : 95 %, v/v); (b) H_2O / CH_3CN , 10 mM C_6MImCl (5 : 95 %, v/v); (c) H_2O , 100 mM ammonium acetate buffer (pH 7.0) / CH_3CN , 10 mM C_6MImCl (5:95 об. %)

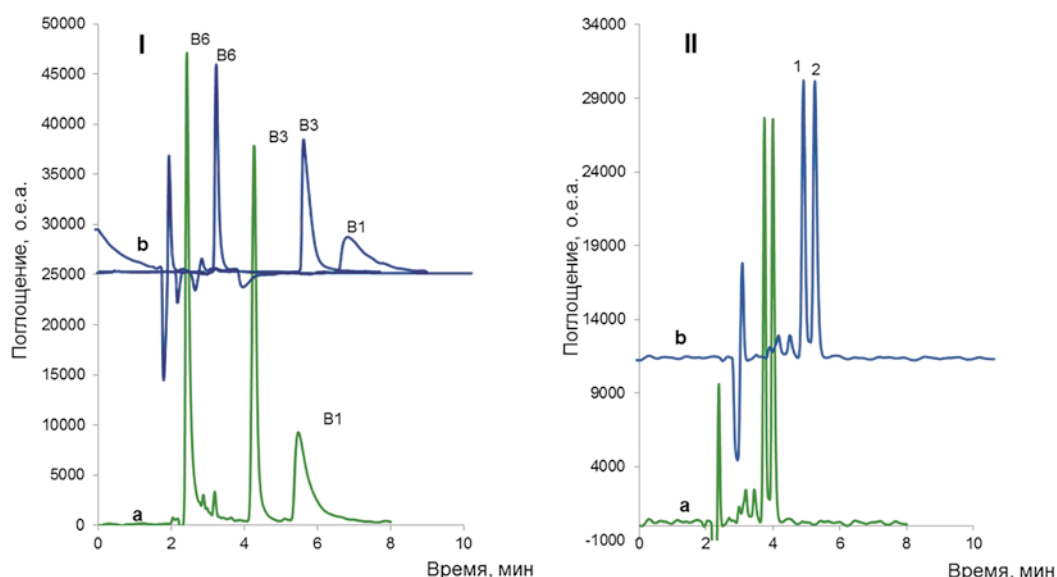


Рис. 2. Хроматограммы водорастворимых витаминов (I) и смеси кетопрофена (1) и ибупрофена (2) (II) в условиях HILIC: в составе элюента C_6MImCl (a) и C_6MImBF_4 (b). Условия: изократический режим элюирования, подвижная фаза: (a) 100 мМ ацетатно-аммиачный буферный раствор (pH = 7.0) / CH_3CN , содержащий 10 мМ C_6MImCl (5 : 95 % об.), (b) 100 мМ ацетатно-аммиачный буферный раствор (pH = 7.0) / CH_3CN , содержащий 10 мМ C_6MImBF_4 (b) (5 : 95 % об.). Остальные условия см. рис. 1

Fig. 2. Chromatograms of water-soluble vitamins (I) and mixture of ketoprofen (1) and ibuprofen (2) (II) under HILIC conditions: C_6MImCl (a) и C_6MImBF_4 (b) in the eluent composition. Conditions: isocratic elution, mobile phase: (a) 100 mM ammonium acetate buffer (pH = 7.0) / CH_3CN , containing 10 mM C_6MImCl (5 : 95 %, v/v), (b) 100 mM ammonium acetate buffer (pH = 7.0) / CH_3CN , containing 10 mM C_6MImBF_4 (b) (5 : 95 %, v/v). Other conditions shown in Fig. 1

личивает эффективность (в 1,5-2 раза) и параметры удерживания полярных аналитов (рис. 1).

Влияние природы противоиона ионной жидкости на параметры удерживания аналитов. ИЖ ведут себя как двойные модификаторы с катионным и анионным характером. Они могут адсорбироваться на поверхности неподвижной фазы, образуя двойной слой, положительно или отрицательно заряженный, в зависимости от относительной силы адсорбции анионов и катионов [12].

Таблица 3

Эффективность и селективность при разделении витаминов и смеси противовоспалительных препаратов в условиях HILIC с ионными жидкостями C_6MImCl и C_6MImBF_4 в составе элюента

Table 3

Efficiency and selectivity of the separation of vitamins and mixture of anti-inflammatory drugs under HILIC with use of ionic liquids C_6MImCl and C_6MImBF_4

Аналиты	C_6MImCl	C_6MImBF_4	C_6MImCl C_6MImBF_4	
	Эффективность, т.т/м		Фактор селективности (α)	
B3	24000 ± 900	18000 ± 700	2.5	1.8
B1	13000 ± 500	7000 ± 300		
Кетопрофен	67000 ± 1500	60000 ± 2700	1.5	1
Ибупрофен	80000 ± 2000	60000 ± 3000		

Обнаружено, что замена Cl^- на более гидрофобный анион BF_4^- , приводит к росту факторов удерживания аналитов (рис. 2), однако эффективность при этом снижается (табл. 3).

Более гидрофобный анион имеет большее сродство к ацетонитрилу, следовательно, большее число анионов ИЖ находится в органическом слое подвижной фазы, что влияет на равновесное распределение аналитов между слоем воды у поверхности сорбента и органическим растворителем. Это, в свою очередь, приводит к росту удерживания полярного аналита в водном слое у поверхности сорбента.

Влияние длины алкильного радикала ионной жидкости на параметры удерживания аналитов. Исследовано влияние длины алкильного радикала (C_4 , C_6 , C_8 , C_{12}) в катионе имидазольевой ИЖ на параметры удерживания аналитов. Установлено, что с ростом числа углеродных атомов удерживание полярных аналитов возрастает за счет большего вклада гидрофобных взаимодействий между ИЖ и сорбентом C18, что сопровождается увеличением слоя воды у поверхности сорбента (рис. 3).

Большие значения эффективности при разделении указанных аналитов отмечены для C_6MImCl (табл. 4), именно поэтому она выбрана для проведения последующих экспериментов.

Влияние pH подвижной фазы на параметры удерживания аналитов. Значение pH элюента оказывает влияние только на аналитическую

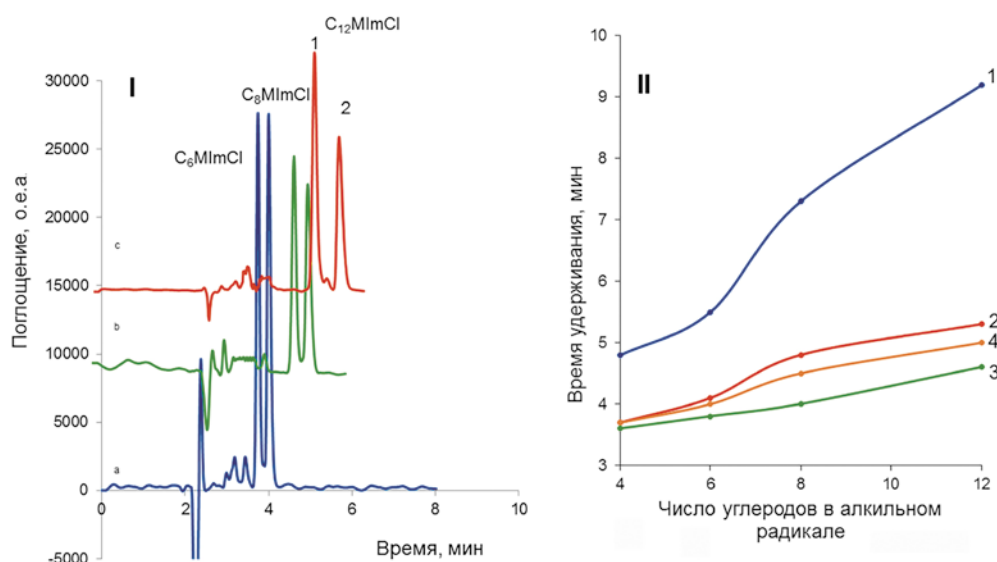


Рис. 3. (I) Влияние длины алкильного радикала ионной жидкости на параметры удерживания кетопрофена (1) и ибупрофена (2). Условия: изократический режим элюирования, подвижная фаза: (а) 100 мМ ацетатно-аммиачный буфер (pH = 7.0) /CH₃CN, содержащий 10 мМ C₆MImCl (5 : 95 % об.), (b) 100 мМ ацетатно-аммиачный буфер (pH = 7.0) /CH₃CN, содержащий 10 мМ C₈MImCl (5 : 95 % об.), (с) 100 мМ ацетатно-аммиачный буфер (pH 7.0) /CH₃CN, содержащий 10 мМ C₁₂MImCl (5 : 95 % об.). Остальные условия как на рис 1. (II) Зависимость параметров удерживания витаминов В1 (1) и В3 (2), кетопрофена (3) и ибупрофена (4) от числа углеродных атомов в алкильном радикале ионной жидкости

Fig. 3. (I) Influence of alkyl radical length of ILs on retention parameters of ketoprofen (1) and ibuprofen (2). Conditions: isocratic elution, mobile phase: a) 100 mM ammonium acetate buffer (pH = 7.0) /CH₃CN, containing 10 mM C₆MImCl (5 : 95 %, v/v), (b) 100 mM ammonium acetate buffer (pH = 7.0) /CH₃CN, containing 10 mM C₈MImCl (5 : 95 %, v/v), (c) 100 mM ammonium acetate buffer (pH = 7.0) /CH₃CN, containing 10 mM C₁₂MImCl (5 : 95 %, v/v). Other conditions shown in Fig. 1. (II) Dependence of the retention parameters of B1 (1), B3 (2), ketoprofen (3), ibuprofen (4) on the number of carbon atoms in the alkyl radical of ionic liquid

форму определяемых соединений и не меняет заряда поверхности сорбента, поскольку заряд имидазольного катиона не зависит от pH.

Выбраны значения pH (3.0 и 7.0) ниже и выше соответствующих значений pK_a исследуемых веществ (табл. 5). При pH = 7 карбоксильная группа анализов диссоциирована, сорбция кислотных

Таблица 4

Значения эффективности (N) при введении в элюент имидазольных ИЖ с различными радикалами

Table 4

Values of efficiency (N) obtained after the introduction of the imidazolium ionic liquids with different alkyl radicals to the eluent

Аналит	Эффективность (N), т.т./м			
	C ₄ MImCl	C ₆ MImCl	C ₈ MImCl	C ₁₂ MImCl
В1	5300 ± 130	13000 ± 500	10000 ± 300	8000 ± 300
В3	13000 ± 260	24000 ± 900	17000 ± 600	14000 ± 400
Кето-профен	57300 ± 1400	67000 ± 1500	54000 ± 1000	60000 ± 1200
Ибупро-фен	52000 ± 1000	80000 ± 2000	53000 ± 800	47000 ± 900

аналитов растет за счет большего вклада электростатических взаимодействий с имидазольным катионом ИЖ.

Влияние концентрации ионной жидкости

C₆MImCl на параметры удерживания аналитов.

При увеличении содержания ИЖ в составе подвижной фазы параметры удерживания витаминов, кетопрофена, ибупрофена, пара-аминосалициловой

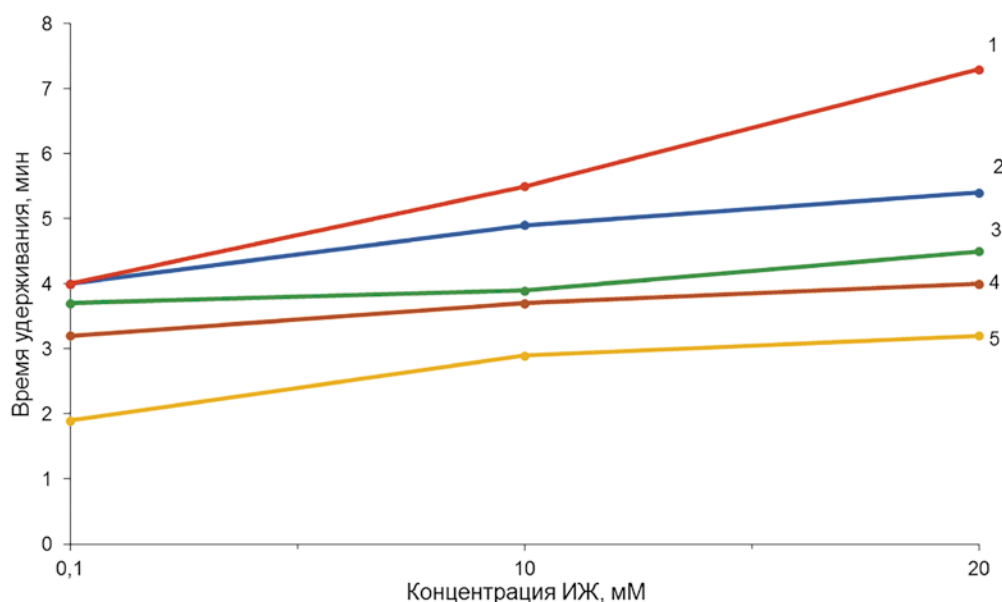
Таблица 5

Значения pK_a, pK_b и времен удерживания определяемых веществ

Table 5

pK_a, pK_b values of detectable substances and their retention parameters

Аналиты	pK _a	pK _b	Время удерживания, мин	
			pH = 3.0	pH = 7.0
Кетопро-фен	4.5	-	3.3 ± 0.1	3.70 ± 0.06
Ибупро-фен	4.9	-	3.60 ± 0.08	4.00 ± 0.03
Фенила-ланин	1.8	9.1	5.4 ± 0.1	6.5 ± 0.1
Тирозин	2.2	9.1	4.7 ± 0.1	5.6 ± 0.2
Трипто-фан	2.4	5.9	4.6 ± 0.2	5.3 ± 0.1



РРис. 4. Зависимость времен удерживания анализов от концентрации ионной жидкости в составе подвижной фазы. (1) – B1, (2) – B3, (3) – ибупрофен, (4) – кетопрофен, (5) – п-аминосалициловая кислота.

Fig. 4. Dependence of the retention times on the concentration of ionic liquid in the composition of mobile phase. (1) – B1, (2) – B3, (3) – ibuprofen, (4) – ketoprofen, (5) – p-aminosalicylic acid

кислоты возрастают (рис. 4). С ростом концентрации ионной жидкости в элюенте увеличивается степень модификации неподвижной фазы, что, в свою очередь, приводит к повышению электростатических взаимодействий между молекулами витаминов, кетопрофена, ибупрофена, п-аминосалициловой кислоты и стационарной фазой.

Исследовано влияние содержания воды в составе п.ф. при pH = 7 на удерживание витаминов B1, B3 и B6, кетопрофена и ибупрофена, триптофана. В условиях гидрофильной хроматографии

вода является растворителем с большей элюирующей силой: при увеличении ее концентрации в подвижной фазе параметры удерживания витаминов снижаются (рис. 5). Доминирует распределительный механизм.

В случае кетопрофена и ибупрофена параметры удерживания проходят через минимум, а затем вновь увеличиваются с ростом содержания воды в элюенте (рис. 5). Скорее всего, в этих условиях происходит смена режима гидрофильной хроматографии на обращенно-фазовый.

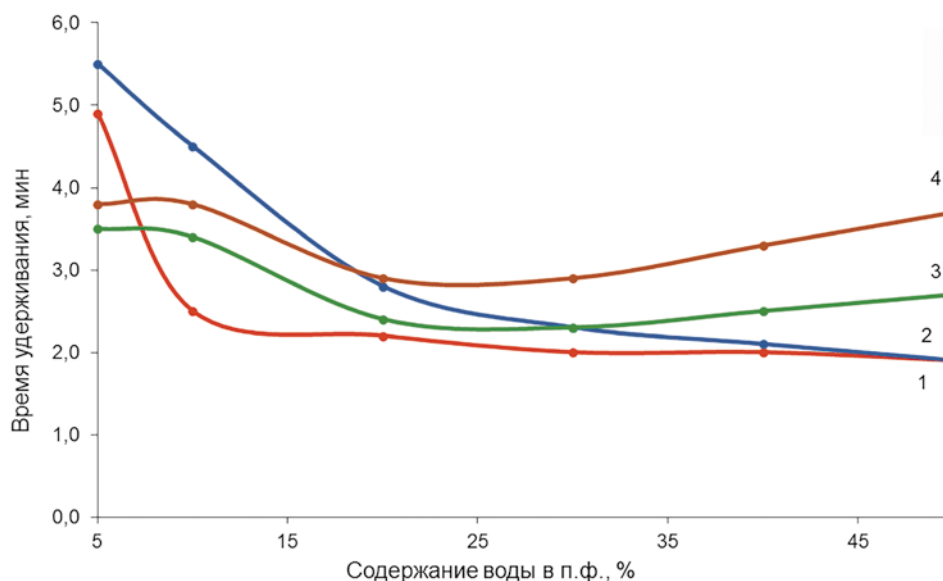


Рис. 5. Зависимость параметров удерживания анализов от содержания воды в подвижной фазе. (1) – B1, (2) – B3, (3) – кетопрофен, (4) – ибупрофен

Fig. 5. Dependence of the retention parameters on the water content in the mobile phase. (1) – B1, (2) – B3, (3) – ketoprofen, (4) – ibuprofen

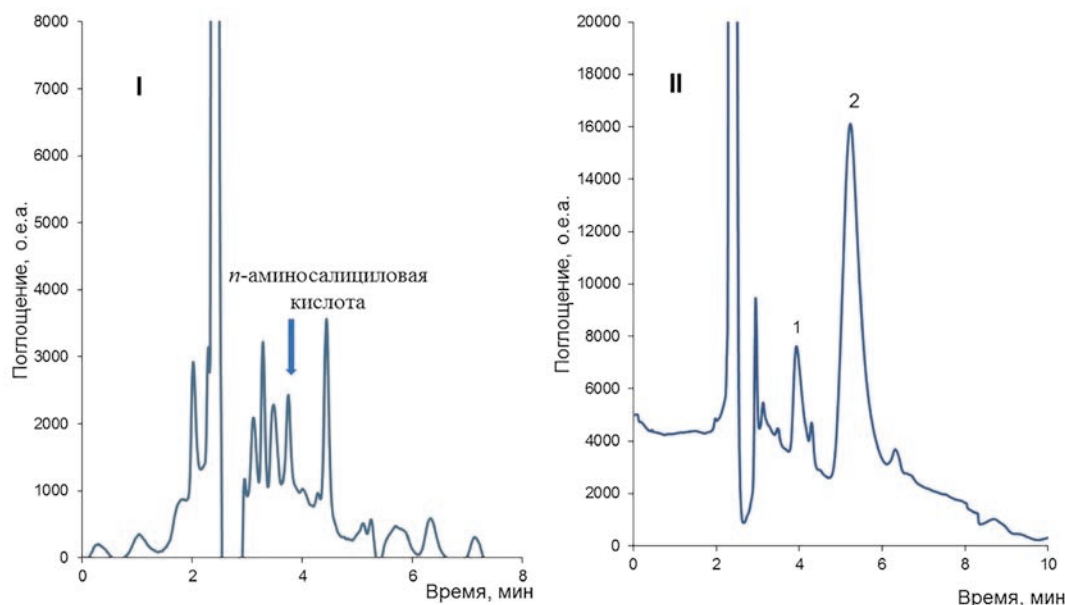


Рис. 6. Хроматограмма образца плазмы крови человека в присутствии *p*-аминосалициловой кислоты (0.1 мкг/мл) (I), антибиотиков спарфлоксацина (1) и левофлоксацина (2) (0.5 мкг/мл) (II). Условия: 100 мМ аммиачно-ацетатный буфер (pH = 7.0)/ CH₃CN, 10 мМ C₆MImCl (2:98 % об.), 275 нм

Fig. 6. Chromatograms of the samples of the human blood plasma in the presence of *p*-aminosalicylic acid (0.1 µg / ml) (I), sparfloxacin (1) and levofloxacin (2) (0.5 µg / ml) (II). Conditions: 100 mM ammonium acetate buffer (pH 7.0)/ CH₃CN, 10 mM C₆MImCl (2 : 9 %, v/v), 275 nm

Таким образом, выбраны условия для реализации режима гидрофильной хроматографии с участием ионной жидкости следующие: 100 мМ ацетатно-аммиачный буфер (pH = 7) / CH₃CN, 10 мМ раствор C₆MImCl (5 : 95, об. %).

В найденных условиях HILIC на обращенно-фазовой колонке, модифицированной ИЖ C₆MImCl, осуществлен анализ плазмы крови человека с добавкой лекарственных препаратов: *p*-аминосалициловой кислоты и антибиотиков (спарфлоксацин, левофлоксацин) (рис. 6). Пробоподготовка плазмы крови заключалась в осаждении белков плазмы крови ацетонитрилом в соотношении 3:1 (объемн.), с последующим ВЭЖХ анализом надосадочной жидкости [20].

Полученные результаты с C₆MImCl сопоставлены с традиционно используемым катионным мо-

дификатором ЦТАБ. Наличие большого алкильного радикала в структуре ЦТАБ в концентрации ниже ККМ, казалось бы, могло обеспечить модификацию поверхности обращенно-фазового сорбента за счет гидрофобных взаимодействий, а присутствие катиона аммония – способствовать формированию водного слоя на поверхности стационарной фазы и, как следствие, реализации режима гидрофильной хроматографии. Однако выполненная серия хроматографических экспериментов не подтвердила эти предположения: образование гидрофобных ионных пар между ЦТАБ и аналитами привело к снижению параметров удерживания аналитов на гидрофильной поверхности.

Проведена сравнительная характеристика методов HILIC с участием ионной жидкости C₆MImCl и ОФ ВЭЖХ по пределам обнаружения полярных

Таблица 6

Значения пределов обнаружения и эффективности для аналитов в условиях HILIC участием ионной жидкости C₆MImCl и ОФ ВЭЖХ

Table 6

Values of detection limits and efficiency for the analytes under HILIC with the use of ionic liquid C₆MImCl and RP HPLC

Аналиты	ПО, нг/мл		Эффективность (N), т.т./м	
	HILIC	ОФ ВЭЖХ	HILIC	ОФ ВЭЖХ
ВЗ	50	1	24000 ± 900	40000 ± 2000
Триптофан	150	2	5800 ± 200	8000 ± 300
<i>p</i> -аминосалициловая к-та	10	5	100000 ± 3000	110000 ± 5000
Спарфлоксацин	45	5	30000 ± 1000	20000 ± 600
Левофлоксацин	15	10	28000 ± 1000	21000 ± 700
Моксифлоксацин	15	10	28000 ± 1000	23000 ± 1000
Кетопрофен	10	2	67000 ± 1500	50000 ± 2000
Ибупрофен	30	10	80000 ± 2000	60000 ± 1000

аналитов (витаминов, аминокислот, антибиотиков, противовоспалительных и противотуберкулезных препаратов) и значениям эффективности (табл. 6).

Пределы обнаружения аналитов в HILIC на порядок выше по сравнению с ОФ ВЭЖХ. Это связано с добавлением в HILIC в состав подвижной фазы ИЖ на основе имидазола, поглощающих в УФ свете ($\lambda_{\text{max}} = 210\text{--}214\text{ нм}$). Однако, для определения лекарственных препаратов в реальных объектах (сыворотка крови, моча) этих значений достаточно. По значениям эффективности HILIC и ОФ ВЭЖХ сопоставимы. Воспроизводимость параметров удерживания составила 3-5 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе работы установлен факт динамической модификации C18 сорбента в условиях ОФ ВЭЖХ ионными жидкостями на основе имидазола, что позволяет реализовывать режим гидрофильной хроматографии. Реализован режим гидрофильной хроматографии с участием ИЖ C_6MImCl и выявлены факторы, определяющие удерживание лекарственных препаратов в условиях HILIC: природа и концентрация ИЖ, pH, концентрация буферного раствора. Лучшие результаты получены в условиях: 100 мМ ацетатно-аммиачный буфер (pH = 7) / CH_3CN , содержащий 10 мМ C_6MImCl (5 : 95 % об.). Показана возможность определения лекарственных препаратов (L-аминосалициловая кислота и антибиотики левофлоксацин, спарфлоксацин) в реальном образце плазмы крови в оптимизированных условиях HILIC. Отмечено, что с использованием традиционного модификатора ЦТАБ с концентрацией ниже ККМ условия HILIC не реализуются. Получены сравнительные оценочные характеристики по пределам обнаружения и параметрам удерживания анализируемых веществ методами HILIC с участием ИЖ и ОФ ВЭЖХ.

Благодарности

Выражаем благодарность Ресурсному центру Методы анализа состава вещества СПбГУ за предоставленное оборудование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ проектов № 16-03-00791-а, 17-03-012182-а.

Acknowledgements

Authors express their gratitude to the Chemical Analysis and Materials Research Centre of SPSU for providing the equipment. This work was supported by the RFBR projects № 16-03-00791-a, 17-03-012182-a.

ЛИТЕРАТУРА

1. Buszewski B., Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. P. 231-247.

2. Alpert A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds // *J. Chromatogr. A.* 1990. V. 499. P. 177-196.
3. Jandera P., Janas P. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography // *Anal. Chim. Acta.* 2017. V. 967. P. 12-32.
4. Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates / A.J. Alpert [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 1994. V. 676. P. 191-202.
5. Churms S.C. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 720. P. 151-166.
6. Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis / A.R. Oyler [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 724. P. 378-383.
7. Li R, Huang J. Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1041. P. 163-169.
8. Olsen B.A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 913. P. 113-122.
9. Xianzhe S., Lizhen Q., Guowang X. Recent development of ionic liquid stationary phases for liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1420. P. 1-15.
10. Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrine by liquid chromatography / L. He [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 1007. P. 39-45.
11. On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography / M.C. García-Alvarez-Coquea [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 883. P. 1-21.
12. Huang Y., Yao S., Song H. Application of ionic liquids in liquid chromatography and electrodriven separation // *J. Chromatogr. Sci.* 2013. V. 51. P. 739-752.
13. N-Methylimidazolium ionic liquid functionalized silica as a sorbent for selective solid-phase extraction of 12 sulfonylurea herbicides in environmental water and soil samples / G. Fang [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. P. 1567-1574.
14. Bi W., Zhou J., Row K.H. Solid phase extraction of lactic acid from fermentation broth by anion-exchangeable silica confined ionic liquids // *Talanta.* 2011. V. 83. P. 974-979.
15. Ionic liquid functionalized silica for selective solid-phase extraction of organic acids, amines and aldehydes / L. Vidal [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1226. P. 2-10.
16. Study of surface-bonded dicationic ionic liquids as stationary phases for hydrophilic interaction chromatography / L. Qiao [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1330. P. 40-50.
17. Imidazolium embedded C8 based stationary phase for simultaneous reversed phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography / X.Q. Qiao [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1400. P. 107-116.
18. A novel surface-confined glucaminium-based ionic liquid stationary phase for hydrophilic interaction/anion-exchange mixed-mode chromatography / L.Z. Qiao [et al.] // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1360. P. 240-247.
19. Versatile ligands for high-performance liquid chromatography overview of ionic liquid-functionalized stationary phase / M. Zhang [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 887. P. 1-16.
20. Бессонова Е.А., Карцова Л.А., Соловьёва С.А. Хроматографическое и хромато-масс-спектрометрическое определение противотуберкулезных препаратов основного ряда в плазме крови. // *Аналитика и контроль.* 2016. Т. 20. № 2. С. 161-167.

21. McCalley D.V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? // *J Chromatogr A*. 2007. V. 1171. P. 46--55
22. McCalley D.V. Effect of mobile phase additives on solute retention at low aqueous pH in hydrophilic interaction liquid chromatography // *J. Chromatogr A*. 2017. V. 1483. P. 71-79.

REFERENCES

1. Buszewski B., Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2012, vol. 402, pp. 231-247. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5
2. Alpert A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of chromatography A*, 1990, vol. 499, pp. 177-196. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)96972-3
3. Jandera P., Janas P. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. *Analytica Chimica Acta*, 2017, vol. 967, pp.12-32. DOI: 10.1016/j.aca.2017.01.060
4. Alpert A.J., Shukla M., Shukla A.K., Zieske L.R., Yuen S.W., Ferguson M.A.J., Mehlert A., Pauly M., Orlando R. *Journal of chromatography A*, 1994, vol. 676, pp. 191-202. DOI: 10.1016/0021-9673(94)00467-6
5. Churms S.C. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. *Journal of chromatography A*, 1996, vol. 720, pp. 151-166. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00306-1
6. Oyler A. R., Armstrong B.L., Cha J.Y., Zhou M.X., Yang Q., Robinson R.I., Dunphy R., Burinsky D.J. Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis. *Journal of chromatography A*, 1996, vol. 724, pp. 378-383. DOI: 10.1016/0021-9673(95)00987-6
7. Li R, Huang J. Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography *Journal of chromatography A*, 2004, vol. 1041, pp. 163-169. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.04.033
8. Olsen B.A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *Journal of chromatography A*, 2001, vol. 913, pp. 113-122. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.09.090
9. Xianzhe S., Lizhen Q., Guowang X. Recent development of ionic liquid stationary phases for liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 2015, vol. 1420, pp. 1-15. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.09.090
10. He L., Zhang W., Zhao L., Liu X., Jiang S. Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrine by liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 2003, vol. 1007, pp. 39-45. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00987-7
11. García-Alvarez-Coquea M.C., Ruiz-Angela M.J, Berthod B A., Carda-Broch S. On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review. *Analytica Chimica Acta*, 2015, vol. 883, pp.1-21. DOI: 10.1016/j.aca.2015.03.042
12. Huang Y., Yao S., Song H. Application of ionic liquids in liquid Chromatography and electrodriven separation. *Journal of Chromatographic Science*, 2013, vol. 51, pp. 739-752. DOI: 10.1093/chromsci/bmt076
13. Fang G., Chen J., Wang J., He J., Wang S. N-Methylimidazolium ionic liquid functionalized silica as a sorbent for selective solid-phase extraction of 12 sulfonylurea herbicides in environmental water and soil samples. *Journal of chromatography A*, 2010, vol. 1217, pp. 1567-1574. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.01.010
14. Bi W., Zhou J., Row K.H. Solid phase extraction of lactic acid from fermentation broth by anion-exchangeable silica confined ionic liquids. *Talanta*, 2011, vol. 83 pp. 974-979. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.11.006
15. Vidal L., Parshintsev J., Hartonen K., Canals A., Riekkola M.L. Ionic liquid functionalized silica for selective solid-phase extraction of organic acids, amines and aldehydes. *Journal of chromatography A*, 2012 vol. 1226, pp. 2-10. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.08.075
16. Qiao L., Li H., Shan Y., Wang S., Shi X., Lu X., Xu G. Study of surface-bonded dicationic ionic liquids as stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of chromatography A*, 2014, vol. 1330, pp. 40-50. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.01.020
17. Qiao X. Q., Zhang L., Zhang N., Wang X., Qin X. Y., Yan H.Y., Liu H.Y.. Imidazolium embedded C8 based stationary phase for simultaneous reversed phase/hydrophilic interaction mixed-mode chromatography. *Journal of chromatography A*, 2015, vol. 1400, pp. 107-116. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.04.060
18. Qiao L.Z., Wang S.Y., Li H., Shan Y.H., Dou A., Shi X.Z., Xu G.W. A novel surface-confined glucaminium-based ionic liquid stationary phase for hydrophilic interaction/anion-exchange mixed-mode chromatography. *Journal of chromatography A*, 2014, vol. 1360, pp. 240-247. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.07.096
19. Zhang M., Mallik A.K., Takafuji M., Ihara H., Qiu H. Versatile ligands for high-performance liquid chromatography overview of ionic liquid-functionalized stationary phase. *Analytica Chimica Acta*, 2015, vol. 887, pp. 1-16. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.022
20. Bessonova E.A., Kartsova L.A., Soloveva S.A. Chromatographic and liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of first-line anti-tuberculosis drugs in human plasma. *Analytics and Control*, 2016, vol. 20 (2), pp. 161-167 (In Russian). DOI: 10.15826/analitika.2016.20.2.007
21. McCalley DV. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *Journal of chromatography A*, 2007, vol. 1171, pp. 46-55. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.047
22. McCalley DV. Effect of mobile phase additives on solute retention at low aqueous pH in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 2017, vol. 1483, pp. 71-79. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.12.035